# SAURE UND ALKALISCHE HISTIDINDECARBOXYLASEN IN RATTENORGANEN

## BESTIMMUNG, EIGENSCHAFTEN UND PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG IHRER AKTIVITÄT

Manfred Gerant

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0021

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der
Chirurgischen Universitätsklinik München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

# SAURE UND ALKALISCHE HISTIDINDECARBOXYLASEN IN RATTENORGANEN BESTIMMUNG, EIGENSCHAFTEN UND PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG IHRER AKTIVITÄT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manfred Gerant
aus
Schweitenkirchen
1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Lorenz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle
Dekan : Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung : 17.1o.1972

Meinen Eltern gewidmet.

I N H A L T

1. Einleitung

1.1. Stellung der Histidindecarboxylase im Histaminstoffwechsel, mögliche physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Histidindecarboxylase bei Magen- und Speichelsekretion und im Schock

1.2. Eigenschaften und Klassifizierung der Histidindecarboxylasen

1.3. Probleme der Bestimmung der Histidindecarboxylasen

2. Experimenteller Teil

Zielsetzung

2.1. Methodik

2.2. Reagentien

3. Ergebnisse

3.1. Vorkommen der Histidindecarboxylasen

3.2. Eigenschaften der Histidindecarboxylasen

3.2.1. Substratoptima und Michaeliskonstanten der Histidindecarboxylasen

3.2.2. pH - Optima der Histidindecarboxylasen

3.2.3. Hemmbarkeit der Histidindecarboxylasen durch DL-α-Methyl DOPA, DL-α-Methylhistidin sowie Aktivierbarkeit durch Benzol

3.2.4. Aktivierung und Hemmung der Histidindecarboxylasen durch Pyridoxal-5'-Phosphat

3.3. Aktivitätssteigerung der sauren Histidindecarboxylase in verschiedenen Rattenorganen durch Thyreoideastimulierendes Hormon und 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol

3.4. Hemmung der sauren und alkalischen Histidindecarboxylasen durch 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol

3.5. Wirkung von Cycloheximid und Puromycin auf die Aktivitätssteigerung der Histidindecarboxylase durch Thyreoideastimulierendes Hormon und 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol

3.6. Wirkung von Antazolin auf das Schilddrüsengewicht

Diskussion

1. Isoenzyme
2. Physiologische Bedeutung der sauren Histidindecarboxylase
3. Frage einer physiologischen Bedeutung der alkalischen Histidindecarboxylase
4. Hypothese einer physiologischen Bedeutung von Histamin in der Schilddrüse
5. Therapie histaminbedingter Zwischenfälle durch Repression
6. Histamin, 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol und Stressulcus Therapeutische Möglichkeiten

Zusammenfassung

Literatur

Lebenslauf

## 1. Einleitung

### 1.1. Stellung der Histidindecarboxylasen im Histaminstoffwechsel, mögliche physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Histidindecarboxylase bei Magen- und Speichelsekretion und im Schock.

Histamin entsteht im Säugeorganismus durch Decarboxylierung von L-Histidin. Nachfolgendes Schema (Lorenz und Pfleger 1968) veranschaulicht die Reaktionen im Histaminstoffwechsel. Danach gibt es für die Histaminbildung zum einen die Reaktivierung, für seine biologische Inaktivierung aber den Vorgang der Methylierung und oxydativen Desaminierung.

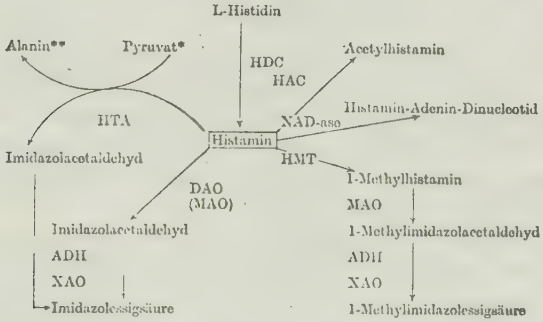


Abb.1.: Histaminstoffwechsel im Säugeorganismus.

Abkürzungen: HDC Histidindecarboxylase; HAC Histamintransacetylase; NAD-ase Diphosphodinucleotidase; HMT Histaminmethyltransferase; MAO Monoaminoxydase; ADH Alkoholdehydrogenase; XAO Xanthinoxydase; DAO Diaminoxydase; HTA Histamintransaminase; Pyruvat*=Pyruvat, Phenylpyruvat, p-Hydroxyphenylpyruvat; Alanin**=Alanin, Phenylalanin, Tyrosin.

Das Endprodukt der Decarboxylierung,nämlich Histamin,ist ein biologisch hochaktiver Stoff.Es stimuliert die Magensaft-und Säureproduktion,führt zur Kontraktion glatter Muskeln und zur Blutdrucksenkung im peripheren Kreislauf.Es stimuliert neben der Magensaftauch die Speichelsekretion (11,14,2o,49,5o) und reguliert den Blutfluß im mikrozirkulatorischen System (36).Es kommt in der Magenschleimhaut in hohen Konzentrationen vor.Hier wird em Histamin eine Mediatorfunktion bei der durch Acetylcholin und Gastrin ausgelösten Magensaftsekretion zugeschrieben.Dabei spielt die Frage, ob Histamin in der Magenschleimhaut in vivo gebildet wird,eine bedeutende Rolle.Das scheinbare Fehlen (21) oder die extrem niedrige Aktivität (2o) der spezifischen Histidindecarboxylase in der Magenfundus- und Corpusregion der meisten Säugerarten wurde als entscheidendes Argument gegen eine solche Funktion des Histamins (16) angeführt.Nur in der Magenschleimhaut der Ratte (34),des Meerschweinchens (25) und des Kaninchens (48) ließ sich bisher eine relativ hochaktive spezifische Histidindecarboxylase nachweisen.

Die Hypothese einer physiologischen Bedeutung des Histamins bei der Magensaftsekretion gewinnt an Wahrscheinlichkeit,nachdem nicht nur an Ratten,sondern erstmals auch in der Magenschleimhaut des Menschen und anderer Säuger die saure Histidindecarboxylase nachgewiesen werden konnte (3o).

Wenn Histamin die genannten Funktionen im Organismus ausübt,dann kommt der sauren Histidindecarboxylase hierbei eine entscheidende Bedeutung zu.Sie sorgt nämlich für die Nachlieferung des Histamins, das ja durch Diaminoxydase und Histaminmethyltransferase rasch inaktiviert wird.Entsprechend beantwortet das Enzym Histaminfreisetzung aus gewebsspezifischen Histaminspeichern (sog. "Nicht-Mastzellhistaminspeichern") mit einer vermehrten Bildung von Histamin, während ein vermehrtes Angebot von Histamin zu einer Abnahme der Enzymaktivität führt.

Kahlson et al. (1964) (2o) haben diesen Vorgang als einen feedback Mechanismus dargestellt.

Nachdem Versuche mit in vitro Hemmstoffen der Histidindecarboxylase in vivo fehlschlugen,stellt der Versuch,durch Repressoren der sauren Histidindecarboxylase möglicherweise histaminbedingte Funktionen einzelner Organe und Gewebe zu beeinflussen,vielleicht einen Weg zur Aufklärung der physiologischen Funktionen von Histamin dar.

Die saure Histidindecarboxylase wurde von Schayer (36) auch als induzierbares Enzym bezeichnet,ohne daß bisher die hierfür notwendigen Beweise geliefert wurden.Ihre Aktivität nimmt nach physiologischen,pharmakologischen und pathologischen Reizen zu: In Speicheldrüsen nach Pilocarpin und Chordareizung,im Magen nach Wärme- und Kälteexposition.Endotoxin- und Tourniquetschock führen in gleicher Weise wie Histaminfreisetzung durch 48/8o,Stress, Entzündung und allergische Reaktionen zu einer erheblichen Steigerung der Enzymaktivität.

## 1.2. Eigenschaften und Klassifizierung der Histidindecarboxylasen

Von Weissbach et al. (47) wurden zwei Typen der Histidindecarboxylasen beschrieben,eine spezifische,die nur L-Histidin umsetzt (pH- Optimum 7,o ,relativ niedrige Michaeliskonstante ($K_m$ um $1o^{-4}$ M) Hemmung durch DL-α-Methylhistidin,nicht aber durch DL-α- Methyl-DOPA und keine Aktivierung durch Benzol),sowie eine unspezifische Histidindecarboxylase,die alle natürlich vorkommenden aromatischen Aminosäuren decarboxyliert (mit einer relativ hohen Michaeliskonstante ($K_m$ $1o^{-2}$ - $1o^{-1}$M) Hemmung durch DL-α-Methyl-DOPA,nicht aber durch DL-α-Methylhistidin,Aktivierung durch Benzol).
Aber einige in den letzten Jahren gefundenen Histidindecarboxylasen zeigen Abweichungen von diesen beiden Enzymtypen,besonders hinsichtlich der Michaeliskonstante und des pH-Optimums,das bei Substratsättigung mehr im Sauren oder mehr im Alkalischen liegt.

Auch alle anderen genannten Eigenschaften sind nur mehr oder weniger typisch für die saure bzw. alkalische Histidindecarboxylase oder wurden bisher an zu wenigen Beispielen untersucht.Eine Ausnahme bildet die Enzymaktivierung durch Benzol,die nur bei Enzymen mit einem pH- Optimum im Alkalischen beobachtet wurde.

So bedeutsam das Problem der Substratspezifität für die Klassifizierung der Histidindecarboxylasen auch geworden ist,so wenig Endgültiges ist hierzu bisher erarbeitet worden.Ein Grund hierfür ist in der relativ geringen Anreicherung zu suchen,die bisher im allgemeinen mit Histidindecarboxylasen aus Säugergeweben erzielt wurde.

Zwei Ansichten stehen sich bei der alkalischen Histidindecarboxylase gegenüber :

1. Es gibt eine unspezifische Histidindecarboxylase, deren Substrate neben L-Histidin alle natürlich vorkommenden L-Aminosäuren, sowie eine Reihe von synthetischen aromatischen L-Aminosäuren sind. Die unspezifische Histidindecarboxylase ist somit identisch mit der DOPA- und 5-HTP-Decarboxylase (44).
   Auf Grund ihrer sonstigen Eigenschaften entspricht sie dem Enzymtyp der Histidindecarboxylase, der hier als alkalische Histidindecarboxylase bezeichnet wird.
2. Es gibt eine (alkalische) Histidindecarboxylase, die hinsichtlich ihres Vorkommens zwar mit der DOPA-Decarboxylase in vielen Organen vergesellschaftet ist, sich aber von ihr im Verlauf der Reinigung abtrennen läßt (51,3,17,4).

Für die erste Hypothese sprechen folgende Befunde: Histidin-und DOPA-Decarboxylierung konnten in vielen Organen nebeneinander nachgewiesen werden, wie in der Glandula submandibularis des Hundes (49), in der Glandula thyreoidea des Hundes (49), im Mäusemastocytom (2) sowie in Niere, Leber und Darm verschiedener Säugetiere (Holtz 1937). Ferner konnte das Enzym an Meerschweinchenniere durch Adsorption an Aluminium $C_\gamma$- Gel und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose 5o - 1oo fach angereichert werden und zeigte auch dann noch in denselben Aktivitätsverhältnissen die Fähigkeit DOPA, 5-Hydroxytryptophan, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin zu decarboxylieren (44).
Durch hohe Konzentrationen von L-Histidin (5o mg/Ansatz) ließ sich die DOPA-Decarboxylase aus Kaninchenniere zu etwa 4o% hemmen (Ganrot et al. 1961), während andrerseits DL-α-Methyl-DOPA, ein starker Hemmstoff der DOPA-Decarboxylase, auch die Histidindecarboxylase hemmte (Werle 1961). Auch L-DOPA selbst hemmte die Histidindecarboxylase (Werle 1942). Diese Untersuchungen mit verschiedenen Hemmstoffen und der gegenseitigen Hemmung sprechen zunächst ebenfalls für eine Decarboxylierung der beiden Aminosäuren durch ein und dasselbe Enzym.
In Ratten, die mit dem Lebercarcinogen Diäthylnitrosamin behandelt wurden, nahm die Aktivität der DOPA-, 5-Hydroxytryptophan- und

Histidindecarboxylase in der Leber parallel zueinander ab. (Reid et al. 1963).Die gleichen Beobachtungen wurden bei Ratten gemacht,die eine tryptophanarme Diät erhielten.(Reid und Shepherd 1964).Behandlung mit Schilddrüsenhormonen über einige Wochen führte ebenfalls zu einer Abnahme der drei genannten Enzymaktivitäten (Ahmed 1963).
Gegen die Identität der alkalischen Histidindecarboxylase mit der "unspezifischen" Histidindecarboxylase im Sinne von Weissbach et al. (46) bzw. der DOPA-Decarboxylase sprechen folgende Gründe:

1. Die parallele Abnahme der Aktivitäten der DOPA-,5-Hydroxytryptophan- und Histidindecarboxylasen nach Behandlung von Ratten mit Diäthylnitrosamin,tryptophanarmer Diät und Schilddrüsenhormonen,die von Shepherd und Mackay (1967) als Argument für die Identität der (alkalischen) Histidin-,der DOPA- und der 5-Hydroxytryptophandecarboxylase angeführt wurden,läßt sich aber auch dadurch erklären,daß die durch die genannten Versuchbedingungen veränderte bzw. veränderbare Größe,nämlich der Gehalt an Vitamin $B_6$-Abkömmlingen,die Aktivität aller drei Enzyme,auch wenn sie nicht miteinander identisch sind,in gleicher Weise beeinflußt: Nämlich durch Verminderung des Cofaktors dieser drei Aminosäuredecarboxylasen.
   Ein Pyridoxal-5'-Phosphatmangel wurde tatsächlich in der Leber nach Verabreichung von Schilddrüsenhormonen nachgewiesen.(6) Diese führt auch zu einer Abnahme einerReihe von anderen Enzymen und ist somit für die genannten Aminosäuredecarboxylasen nicht spezifisch.
2. Die DOPA-Decarboxylase der Meerschweinchenniere konnte bei der Anreicherung des Enzyms mit anderen als den genannten Methoden doch von der Histidindecarboxylase abgetrennt werden.Dies gelang WERLE und AURES (51) bereits durch den Hitzeschritt als erstem Schritt ihres Anreicherungsverfahrens.Ihre Befunde wurden bestätigt durch Awapara et al. (4),die nach Anreicherung des Enzyms durch Ammoniumsulfatfraktionierung eine DOPA-Decarboxylase aus der Meerschweinchenniere erhielten,die zwar DOPA, 5-Hydroxytryptophan,o-Tyrosin und m-Tyrosin nicht aber Histidin und einige andere aromatische Aminosäuren decarboxyliert.
3. Auch die DOPA-Decarboxylase aus Rattenleber ließ sich von der

alkalische Histidindecarboxylase durch Chromatografie an DEAE-Sephadex abtrennen (3).

4. Die Aktivitäten der Histidindecarboxylase und der DOPA-Decarboxylase in der Schweineniere und verschiedenen Nervengeweben verlaufen nicht zueinander parallel: Gewebe mit hoher DOPA-Decarboxylaseaktivität zeigten eine niedrigere Histidindecarboxylaseaktivität und umgekehrt.
5. Histidindecarboxylase wird durch D-DOPA stark gehemmt, nicht aber die DOPA-Decarboxylase (Werle 1942). Benzol aktiviert die Decarboxylierung von Histidin, nicht aber von DOPA und 5-Hydroxytryptophan.

Somit ist wahrscheinlich, daß alkalische Histidindecarboxylase und DOPA-Decarboxylase in vielen Geweben zwar vergesellschaftet sind, aber doch zwei verschiedene Enzyme darstellen. Da die alkalische Histidindecarboxylase der Meerschweinchenniere auch in vivo Histamin bildet (35), besteht kein Grund mehr, sie als DOPA-Decarboxylase mit "artificieller" Histidindecarboxylaseaktivität in vitro zu bezeichnen.

Die saure Histidindecarboxylase ist nach Weissbach et al. (47) als spezifische Histidindecarboxylase zu bezeichnen, da sie nur L-Histidin decarboxyliert. Dagegen zeigten Kahlson et al. 1963 (19), daß die saure Histidindecarboxylase auch in größerem Umfang DL-α-Methylhistidin umsetzt. Sie ist somit nicht mehr als streng spezifisch anzusehen. Auch weitgehend gereinigte saure Histidindecarboxylase aus Mäusemastocytomen decarboxylierte neben Histidin, DOPA und 5-Hydroxytryptophan (2). Damit erscheint die Frage der Substratspezifität auch bei der sauren Histidindecarboxylase ein bis heute ungelöstes Problem. Entsprechend des im Sauren oder im Alkalischen liegenden pH-Optimums wäre nun eine Unterteilung dieser Enzyme in den Typus der sauren und alkalischen Histidindecarboxylase vorzunehmen (Tab. 1), da eine Unterscheidung nach der Substratspezifität nicht mit Sicherheit möglich ist und andrerseits in der Literatur kein histidindecarboxylierendes Enzym bekannt ist, das man nicht in diese beiden Kategorien einreihen könnte (24, 3o, 49).

Es erhob sich die Frage, ob vielleicht die beiden Enzymtypen nur zwei aktive Zentren an ein und demselben Apoenzym darstellen. Die Frage konnte bei den Histidindecarboxylasen der Schweineschilddrüse von Werle und Lorenz 1966 (49) geklärt werden. Nach Gelfiltration

Tabelle 1

Eigenschaften der sauren und alkalischen Histidindecarboxylase (nach LORENZ und PFLEGER 1968). (28)

| Eigenschaften | saure HDC | alkalische HDC |
|---|---|---|
| pH-Optimum | 6,o - 7,2 | 7,5 - 9,5 |
| Temperatur-Optimum | 37°C | 37°C |
| Michaelis-Konstante | $6x1o^{-7}$ - $1o^{-3}$ M | $1,7x1o^{-3}$ M |
| Coenzym | Pyridoxal-5'-Phosphat | Pyridoxal-5'-Phosphat |
| optimale Pufferkonzentration | o,2 M | bis o,4 M |
| Ammoniumsulfatfällung | bei 3o-4o% Sättigung | bei 4o-5o% Sättigung |
| Hemmung durch α-Methyl-DOPA | nur in hohen Konzentrationen ($5x1o^{-3}$-$1x1o^{-2}$ M) | bereits durch $5x1o^{-4}$M durch $1o^{-3}$M zu 1oo% |
| Hemmung durch α-Methylhistidin | $1x1o^{-2}$M hemmt zu 1oo% | nicht hemmbar |
| Benzol (2o mg) | hemmt bis zu 6o% | aktiviert bis zu 6oo% |
| Tris-Maleat (o,1 M) | hemmt bis zu 1oo% | hemmt nicht |
| p-Chlormercuribenzoat ($5 x 1o^{-4}$ M) | hemmt nicht, mit Ausnahme des Rattenmagens | hemmt bis zu 1oo% |

an Sephadex G 1oo erschienen die saure und alkalische Histidindecarboxylase voneinander getrennt im Eluat,als erste das alkalische Enzym.Es hat wahrscheinlich ein höheres Molekulargewicht als die saure Histidindecarboxylase.Ob dies für die Enzyme aus allen Organen gilt,ist bisher nicht geprüft worden.
Werle und Lorenz (1966) (49) fanden noch weitere Unterschiede zwischen der sauren und alkalischen Histidindecarboxylase: Die saure Histidindecarboxylase setzte Histidin maximal bei einer Phosphatpufferkonzentration von o,2 M um,die alkalische bei einer Konzentration von o,4 M (siehe Tab. 1).Durch o,1 M Tris-Maleat- und TRA-Puffer wird die saure,nicht dagegen die alkalische Histidindecarboxylase gehemmt (49).

## 1.3. Probleme der Bestimmung der Histidindecarboxylasen

Der Nachweis der Histidindecarboxylasen ist in vielen Fällen sehr schwierig.Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist,erfolgt der Umsatz von Histamin durch eine ganze Reihe von Enzymen,die in den verschiedenen Organen nicht gleichmäßig verteilt sind.Daher müssen bei der Bestimmung der Histidindecarboxylase im Rohextrakt für jedes Organ die optimale Zusammensetzung und Konzentration von Hemmstoffen des Histaminumsatzes ermittelt werden. Dies wurde dadurch erschwert,daß Hemmstoffe des Histaminumsatzes, so Aminoguanidin als Inhibitor der Diaminoxydase,in höherer Konzentration auch Hemmstoffe der Histidindecarboxylase sind. Deshalb mußten Hemmkonzentrationen ermittelt werden,die die Enzyme des Histaminabbaus schon,die Histidindecarboxylase aber noch nicht hemmen.Zusammensetzung und Konzentration der Inhibitoren siehe Tab. 2 .Dabei hemmt Aminoguanidin die Diaminoxydase, Chlorpromazin die N-Methyltransferase und Nicotinamid die Diphosphopyridinnucleotidase.
Die sehr geringen Enzymaktivitäten,die bei der Histidindecarboxylase im pMol/min und mg Protein-Bereich liegen,machen hochempfindliche Bestimmungsmethoden notwendig,wie etwa die fluorometrische Methode,bei der noch 1 ng Histamin exakt gemessen werden kann.
Schließlich ist noch die relativ hohe Konzentration an freiem

Tabelle 2

Als günstig ermittelte Zusammensetzung und Konzentrationen von Hemmstoffen des Histaminumsatzes bei der Bestimmung von Histidindecarboxylasen menschlicher und tierischer Organe.

| Spezies und Organ | Enzymtyp | Zusammensetzung und Konzentration der Hemmstoffe | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Aminoguanidin (M) | Chlorpromazin (M) | Nicotinamid (M) |
| Mensch, Magen | sa | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | $1 \times 10^{-2}$ |
| Tonsillen | sa+alk | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | - |
| Gl.submandibularis | sa | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | $5 \times 10^{-4}$ | - |
| Gl.submandibularis | alk | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | - |
| Gl.parotis | sa | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | $5 \times 10^{-4}$ | - |
| Schwein, Magen | sa | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | $1 \times 10^{-2}$ |
| Gl.submandibularis | sa+alk | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | - |
| Gl.thyreoidea | sa | $6{,}25 \times 10^{-4}$ | $1 \times 10^{-3}$ | - |
| Gl.thyreoidea | alk | $5{,}0 \times 10^{-4}$ | - | - |
| Meerschweinchen, Magen | sa | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | $1 \times 10^{-2}$ |
| alle and.Organe d. Verdauungstraktes | sa+alk | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | $5 \times 10^{-4}$ | - |
| Ratte, Magen | sa | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | $1 \times 10^{-2}$ |
| alle and.Organe d. Verdauungstraktes | sa +alk | $1{,}3 \times 10^{-4}$ | - | $1 \times 10^{-2}$ |

Histidin im Gewebe zu berücksichtigen.Deshalb darf keinesfalls bei Homogenaten oder Rohextrakten die Aktivität der Histidindecarboxylase aus der Differenz von Haupt- und Leeransätzen errechnet werden,da es hierbei zu Fehlern bis zu 5o% kommen kann (49,26).Es wurden deshalb als Kontrollwerte Ansätze mit säureinaktiviertem Enzym verwendet.

## 2. Experimenteller Teil

Zielsetzung: Diese Arbeit hat es sich zur Aufgabe gestellt, die Existenz der Histidindecarboxylasen in verschiedenen Organen, hauptsächlich bei der Ratte, nachzuweisen, sie zu klassifizieren und ihre Stellung im Histaminstoffwechsel zu diskutieren. Die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung ihrer Aktivitäten soll untersucht werden. Der Sinn und Wert des Nachweises und der Aktivitätsbestimmung der Histidindecarboxylasen ergibt sich aus der Bedeutung dieser Enzyme für den Beweis einer physiologischen oder pathophysiologischen Funktion des Histamins im Organismus.

### 2.1. Methodik

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in der Warburgapparatur oder im Gallenkamp-Schüttler bei 37°C unter $N_2$-Atmosphäre. Im Warburghauptgefäß befanden sich o,8 ml Rohextrakt, 1,5 - 1,3 ml Puffer (o,4 M $Na_2HPO_4$ / $KH_2PO_4$ , pH entsprechend dem Optimum des Enzyms) o,1 ml Hemmstoff des Histaminumsatzes (jeweilige Endkonzentration siehe Tab. 2), bei Verwendung von Aminoguanidin, Chlorpromazin und Nicotinamid also insgesamt o,3 ml.
Im Seitengefäß befand sich o,5 ml L-Histidin (Endkonzentration entsprechend der optimalen Substratkonzentration $1x1o^{-4}$ -$1x1o^{-2}$M). Das Endvolumen des Ansatzes betrug 3,o ml. Die Ansätze waren in bidest. Wasser gelöst, um eine möglichst gleiche Pufferkonzentration von o,4 M im Ansatz zu gewährleisten. Zu den Ansätzen der alkalischen Histidindecarboxylase wurde außerdem noch Benzol ($2,5 \times 1o^{-4}$ M) zugegeben (o,o5 ml), das aus noch ungeklärten Gründen zu einer Aktivierung des Enzyms führt (Waton 1956) (45). Die Reaktion wurde dann durch Zugabe des Substrates gestartet.
Nach 5 , 1o , 15min. wurde jeweils in einem Ansatz die Reaktion mit o,5 ml 3 N Perchlorsäure gestoppt und als Maß der Enzymaktivität die neugebildete Histaminmenge spektrofluorometrisch bestimmt, wobei statt 1o ml n-Butanol in der Orginalmethode nach Shore et al. 1959 (41) ein Gemisch von 6 ml n-Butanol und 4 ml Chloroform verwendet wurde, um die hohen Histidinmengen im Ansatz mit größerer Sicherheit von Histamin abzutrennen (Burkhalter 1962) (9). Die Spezifität der Ergebnisse wurde am isolierten Meerschwein-

chenileum überprüft.

Proteinbestimmung:

Nach der Biuretmethode nach Weichselbaum 1946 (46)

Definition:

Die Enzymaktivität wird in pMol Histaminzuwachs/min u mg Protein angegeben.Der Histaminzuwachs wird aus der Differenz ... Haupt- und Nullwert bestimmt und zwar als Mittelwert der Ansätze nach 5 , 1o , 15 min. (Linearer Bereich der Zeitumsatzkurve!).
Als Nullwert wird der Histaminwert in Ansätzen mit säureinaktiviertem Enzym und Substratzusatz,als Hauptwert der gleiche Ansatz ohne Säureinaktivierung bezeichnet.

Histidinbestimmung:

Spektrofluorometrisch nach Pisano et al. 1957 (33).

Beschreibung der chronischen Versuche mit den Ratten

Als Versuchstiere dienten ausschließlich junge,gleichaltrige, weibliche Wistar-Ratten derselben Zucht mit einem Gewicht zwischen 19o - 23o g.Sie wurden in Gruppen zu zehn Tieren gehalten,vor Versuchsbeginn zwei Tage eingewöhnt und mit Altromin$^{R}$-Diät gefüttert. Wasser nach Belieben.Nach Beendigung der Versuche fasteten die Tiere 24 Stunden,wurden mit Äther narkotisiert und durch Herzincision getötet.Die benötigten Organe - mit Ausnahme der Leber wurde jeweils ein Organpool von je 1o Tieren gebildet - wurden sofort entnommen und bei -2o$^{o}$ C eingefroren.Verarbeitung innerhalb einer Woche.
Das Vorkommen von Histamin und die Histidindecarboxylasenaktivitäten in den einzelnen Organen wurden durch eine verschieden große Anzahl von Versuchen ermittelt.So wurden die Werte von Herz,Duodenum und Pankreas nur in einer Versuchserie aus einem Organpool von jeweils 1o Tieren ermittelt,während sich die Meßdaten bei der Leber aus 26 Versuchen ergaben.Die sehr kleinen Schilddrüsen mit einem Durchschnittsgewicht von nur 3o mg wurden sorgfältig herauspräpariert.Hier mußte jeweils ein Organpool von 3o Tiren gebildet werden.Bei der Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussung der sauren Histidindecarboxylase wurde zunächst eine Behandlung mit

thyreotropem Hormon durchgeführt. Einteilung der Ratten in zwei Gruppen zu jeweils 1o Tieren. Die eine fungierte als Kontrollgruppe und erhielt lediglich physiologische Kochsalzlösung intramuskulär injiziert, während die Versuchsgruppe zwei Tage Thyreostimulin "Organon" in einer Dosis von täglich 5o I.E./kg Körpergewicht - gelöst in o,1 ml bidest. Wasser - intramuskulär appliziert bekam. Entnommen wurden: Leber, Niere, Gl.submandibularis, G.parotis, Gl.thyreoidea, Thymus und Herz.
Eine weitere Versuchsreihe wurde mit dem in vitro stärksten Hemmstoff beider Histidindecarboxylasen, nämlich 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol gestartet. 1o Ratten erhielten über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich 5o mg/kg Körpergewicht dieser in o,5 ml o,o1 N Natronlauge löslich gemachten Substanz intramuskulär. 1o Tiere liefen als Kontrollgruppe, behandelt mit o,o1 N NaOH. Nach Versuchsbeendigung wurden entnommen: Leber, Niere, Magen, Gl.submandibularis, Gl.thyreoidea und Gl.parotis.
Es folgten Versuche mit 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol an zwei Gruppen von je 1o Tieren über 21 Tage. Kontrollgruppe wie vorher. Die erste Gruppe wurde mit o,3 mg/kg, die zweite mit 3 mg/kg Körpergewicht der in o,5 ml o,9% iger Kochsalzlösung gelösten Substanz behandelt. Von den mit 3 mg/kg gespritzten Tieren starben vier nach wenigen Tagen. Den übrigen wurden entnommen: Leber, Niere, Magen, Gl.submandibularis, Gl.parotis, Gl.thyreoidea, Thymus und Zunge.
Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid und Puromycin. 3 Versuchsgruppen zu wieder je 1o Tieren, eine davon als Kontrollgruppe in beschriebener Weise, wobei Thyreostimulin allein verabreicht wurde. Die erste Gruppe erhielt 2 Tage 5o I.E./kg Körpergewicht Thyreostimulin "Organon" + o,4 mg/kg Cycloheximid; die zweite Gruppe statt Cycloheximid 6 mg/kg Puromycin - gelöst in o,1 ml o,9% iger NaCl. Entnommen wurden: Leber, Niere, Magen, Gl.submandibularis, Gl.parotis und Gl.thyreoidea.
In Fortführung obiger Versuchsreihe wurden nun 2 Serien zu je 3 Gruppen mit jeweils 1o Tieren gebildet. Die erste Gruppe der ersten Serie erhielt 5o mg/kg 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol 6 Tage lang, die zweite Gruppe noch zusätzlich o,2 mg/kg Cycloheximid intramuskulär. Die erste Gruppe der zweiten Serie bekam Thyreostimulin "Organon" 5o I.E./kg zwei Tage, die zweite Gruppe noch zusätzlich o,2 mg/kg Cycloheximid intramuskulär. Jeweils eine Kontrollgruppe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Entnommen wurden: Leber, Niere, Magen, Gl.submandibularis, Gl.parotis und Gl.thyreoidea.

Den Abschluß der Versuche im Rahmen dieser Arbeit bildete die Untersuchung des Einflusses von Antazolin und 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol auf das Schilddrüsengewicht.
Es wurden 4 Gruppen zu je 6 Tieren gebildet. Über 21 Tage erhielten nun die 1. Gruppe : 5o mg/kg 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol
die 2. Gruppe : 1 mg/kg Antazolin
die 3. Gruppe : 1o mg/kg Antazolin
die 4. Gruppe als Kontrollgruppe o,5 ml o,9% ige Kochsalzlösung.
Die Substanzen wurden, gelöst in o,5 ml o,9% iger NaCl, intramuskulär verabreicht.
Die Schilddrüsen wurden sorgfältig herauspräpariert und beide Hälfte gewogen.

## 2.2. Reagentien

Rohextrakte der Histidindecarboxylasen wurden durch Homogenisieren der Organe mit dem Ultraturax unter Zusatz von 2 Teilen bidest. Wasser gewonnen, da die Enzyme in verschiedenen Puffern sehr instabil sind (Werle und Lorenz 1966) (5o). Zentrifugierdauer 1-2 min. bei 18oo xg. Der Überstand diente als Enzymlösung.
Ultrazentrifugatextrakte wurden durch 3o min. Zentrifugieren der Rohextrakte bei $0^{o}$ C und 1oo ooo xg gewonnen. Der Überstand diente als Enzymlösung.

Als Substanzen fanden Verwendung: Histamindihydrochlorid und L-Histidin (Base) (Hoffmann-La Roche); Pyridoxal-5'-Phosphat (Hoffmann-La Roche und Fluka AG); Aminoguanidinsulfat (Fa. Schuchardt α- Methyl-DOPA und α- Methylhistidin (Merck, Sharp & Dohme, West Point U.S.A.); o-Phthaldialdehyd (Fluka), umkristallisiert in Petroläther, Siedepunkt : 5o - 7o°C ; Nicotinamid (Merck, Darmstadt); Chlorpromazin (2-Chlor-1o-(3-dimethylaminopropyl) phenothiazinchlorid) (Megaphen$^{R}$) (Bayer); Benzol (Merck)
Lösungsmittel: Methanol, n-Heptan, Chloroform (Uvasole, Merck); n-Butanol (Riedel de Häen);
Pharmaka : Thyreostimulin "Organon", Puromycin; Cycloheximid; Antazolin; 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol; 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol.

## 3. Ergebnisse.

### 3.1. Vorkommen der Histidindecarboxylasen.

In allen untersuchten Organen von Ratten konnte mit der fluorometrischen Bestimmungsmethode die saure Histidindecarboxylase nachgewiesen werden. Tab. 3

Jeder Einzelwert, mit Ausnahme der Leber, wurde aus einem Organpool von je 1o Tieren erhalten; das gilt auch für die weiteren Untersuchungen. Der Histamingehalt ist in $\mu g/g$ Frischgewicht, die Histidindecarboxylase-Aktivität in pMol Histaminzuwachs/min. und mg Biuretprotein angegeben.
Die höchste Aktivität fand sich in Magen, Schilddrüse, Duodenum und Speicheldrüsen, die niedrigste in Herz, Leber und Niere. Das $p_H$-Optimum lag zwischen 5,5 - 6,o bei der sauren und zwischen 8,o - 8,1 bei der alkalischen Histidindecarboxylase. Man erkennt eine gute Korrelation zwischen Histamingehalt und Aktivität der Histidindecarboxylasen. Tab. 4
Erstmals ließ sich die saure Histidindecarboxylase auch in Pankreas und Duodenum nachweisen. Allerdings ergab sich beim Pankreas eine große Streubreite.
Auffallend hoch ist auch die Aktivität der alkalischen Histidindecarboxylase in den genannten Organen, jedoch konnte eine Beziehung des Enzyms zur physiologischen Funktion von Histamin noch nicht gesichert werden. (Lorenz und Pfleger 1968) (28)

Auch in Meerschweinchenorganen finden sich hohe Aktivitäten der sauren Histidindecarboxylase in Magen und Schilddrüse. Die höchste Aktivität wies überraschenderweise der Ösophagus auf. Dagegen zeigte die Gl.submandibularis eine sehr geringe Aktivität. Tab. 5
Die alkalische Histidindecarboxylase weist im Magen eine hohe , in der Schilddrüse eine mittlere und in der Gl.submandibularis eine relativ niedrige Aktivität auf.

Tabelle 3

Vorkommen von Histamin und saurer Histidindecarboxylase in Organen der Ratte.

| Organe | n | Histamingehalt in $\mu g/g$ | Histidindecarboxylierung in pMol/min u.mg Protein |
|---|---|---|---|
| Gl. submaxillaris | 6 | 14,2 ± 4,6 | 8,9 ± 2,7 |
| Gl. parotis | 4 | 34,2 ± 1,1 | 5,7 ± 1,3 |
| Gl. thyreoidea | 5 | 36,1 ± 6,2 | 13,3 ± 3,5 |
| Thymus | 4 | 15,8 ± 1,2 | 1,4 ± 0,3 |
| Herz | 1 | 2,4 | 1,0 |
| Magen | 6 | 26,2 ± 1,8 | 25,7 ± 10,8 |
| Duodenum | 1 | 13,2 | 12,0 |
| Pankreas | 1 | 6,6 | 3,0 |
| Leber | 26 | 2,1 ± 0,12 | 0,56 ± 0,07 |
| Niere | 6 | 1,0 ± 0,13 | 0,45 ± 0,27 |

Tabelle 4

Histidindecarboxylierung durch Rohextrakte von Organen der Ratte.

| Organe | Histidindecarboxylierung in pmol Histaminzuwachs/min und mg Protein | | | |
|---|---|---|---|---|
| | n | pH 5,5 - 6,o | n | pH 8,o - 8,1 |
| Gl.submandibularis | 6 | 8,9 ± 3,7 | 3 | 16,4 ± 1,4 |
| Gl.parotis | 5 | 7,7 ± 3,o | 3 | 7,8 ± 5,o |
| Gl.thyreoidea | 5 | 11,5 ± 3,4 | 3 | 15,5 ± 5,2 |
| Thymus | 6 | 5,3 ± 3,4 | 3 | 12,5 ± 3,6 |
| Herz | 1 | 1,o | - | - |
| Magen | 1o | 29,3 ± 9,2 | 3 | 42,5 ± 5,o |
| Duodenum | 1 | 12,o | - | - |
| Pankreas | 3 | 9,9 ± 8,o | 3 | 7,o ± 1,6 |
| Leber | 2o | o,5 ± o,1 | 3 | 1,9 ± o,1 |
| Niere | 9 | o,8 ± o,1 | 5 | o,6 ± o,1 |

Organextrakte von jeweils 1o - 15 Ratten gemischt,mit Ausnahme von Leber,Niere und Magen,wo jeweils die Organe von 1 - 4 Tieren verwendet wurden.Mittelwerte ± Standardabweichung.
Sonstiges siehe Methodik!
n = Anzahl der Versuche.
Die Tiere hatten 24 Stunden gefastet.

Tabelle 5

Histidindecarboxylierung durch Rohextrakte von Organen des Meerschweinchens bei pH 6,5 - 7,o und 8,o

| Organe | Enzymaktivität in pMol Histaminzuwachs/min und mg Protein. | |
|---|---|---|
| | pH 6,5 - 7,o | pH 8,o - 8,1 |
| Zunge | 4,7 ± o,8 | 1,1 ± o,4 |
| Gl.submandibularis | 1,1 ± o,7 | 1,9 ± o,2 |
| Gl.thyreoidea | 8,3 ± o,5 | 3,7 ± o,4 |
| Thymus | 3,3 ± 2,2 | 7,3 ± 1,8 |
| Oesophagus | 21,6 ± 12,o | 4,o ± 1,1 |
| Magen, Fundus | 16,4 ± 9,1 | 15,3 ± 6,5 |
| Corpus | 13,8 ± 1,5 | 25,4 ± 6,5 |
| Pylorus | 13,1 ± o,8 | 38,5 ± 5,9 |

Organe von je 1o Tieren wurden gemischt.
Mittelwerte ± Standardabweichung.
Sonstige Bedingungen siehe Methodik.
Die Tiere hatten 24 Stunden gefastet.

In der Gl. submandibularis des Menschen und verschiedener Säugetiere konnte die saure und alkalische Histidindecarboxylase ohne Ausnahme nachgewiesen werden,meist jedoch mit relativ geringer Aktivität.Die alkalische setzte bei Schwein und Ratte Histamin verhältnismässig schnell um. Tab. 6

In der Gl.parotis fand sich die saure Histidindecarboxylase bei Mensch und Ratte recht aktiv,die alkalische dagegen nur bei der Ratte. Tab. 7

In der Schilddrüse war die Aktivität beider Enzyme verhältnismäßig gross.Am raschesten setzte die Gl. thyreoidea des Schweines Histidin um. Tab. 8

Im Magen konnte die saure Histidindecarboxylase bei allen untersuchten Arten,einschließlich des Menschen,in ausnahmslos hoher Aktivität nachgewiesen werden.Die höchste Enzymaktivität findet sich im Fundus-Corpus-Bereich,doch konnte das Enzym auch im Antrum bestimmt werden. Tab. 9

Tabelle 6

Histidindecarboxylierung durch Ultrazentrifugatextrakte der Gl. submandibularis verschiedener Arten.

| Art | Histidindecarboxylierung in pmol Histaminzuwach min und mg Protein. | | | |
|---|---|---|---|---|
| | n | pH 6,5 - 7,o | n | pH 8,0 |
| Mensch | 6 | 1,4 ± o,7 | 6 | o,6 ± 0,2 |
| Schwein | 3 | 3,7 - 2,o | 2 | 9,o |
| Ratte | 6 | 8,9 ± 3,7 | 3 | 16,4 ± 1,4 |
| Meerschweinchen | 3 | 1,1 ± o,7 | 3 | 1,9 ± o,2 |

Mittelwerte ± Standardabweichung
n = Anzahl der Versuche
Bei Ratte und Meerschweinchen wurden die Organe von lo Tieren gemischt. Das pH-Optimum der sauren HDC bei der Ratte betrug 6,1.
Sonstige Bedingungen siehe Methodik !

Tabelle 7

Histidindecarboxylierung durch Ultrazentrifugatextrakte der Gl. parotis von Mensch und Ratte.

| Art | Histidindecarboxylierung in pmol Histaminzuwachs/ min und mg Protein. | | | |
|---|---|---|---|---|
| | n | pH 6,5 - 7,0 | n | pH 8,0 |
| Mensch | 3 | 2,7 $\pm$ 1,1 | 3 | 1,7 $\pm$ 0,4 |
| Ratte | 5 | 7,7 $\pm$ 3,0 | 3 | 7,8 $\pm$ 5,0 |

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.
n = Anzahl der Versuche
Bei der Ratte wurden die Organe von 10 Tieren gemischt.
Das pH-Optimum der sauren Histidindecarboxylase bei der Ratte betrug 6,1.
Sonstige Bedingungen siehe Methodik.

Tabelle 8

Histidindecarboxylierung durch Ultrazentrifugatextrakte der Gl. thyreoidea verschiedener Säugetiere.

| Art | Histidindecarboxylierung in pmol Histaminzuwachs/ min und mg Protein | | | |
|---|---|---|---|---|
| | n | pH 6,5 - 7,0 | n | pH 8,0 |
| Schwein | 6 | 26,0 ± 9,3 | 6 | 22,2 ± 7,2 |
| Ratte | 5 | 11,5 ± 3,4 | 3 | 15,5 ± 5,2 |
| Meerschweinchen | 3 | 8,3 ± 0,5 | 3 | 3,7 ± 0,4 |

Mittelwerte ± Standardabweichung. Bei Ratten und Meerschweinchen wurden die Organe von jeweils 10 Tieren verwendet.
n = Anzahl der Versuche.
Sonstiges siehe Methodik.
Bei Hund, Schwein wurde jeweils auf Zellprotein 1/3 des Gesamtproteins der Schilddrüse bezogen (vgl. hierzu WERLE und LORENZ 1966. Das pH-Optimum bei den Rattenschilddrüsen betrug 5,7.

Tabelle 9

Histidindecarboxylierung bei pH 6,8 - 7,0 in Ultrazentrifugatextrakten der Magenschleimhaut verschiedener Säugetiere.

| Art | Histidindecarboxylierung in pmol Histaminzuwachs/min. und mg Protein. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | Fundus | n | Corpus | n | Antrum |
| Mensch | 7 | 10,6 ± 2,6 | 12 | 7,1 ± 1,4 | 3 | 4,9 ± 1,2 |
| Schwein | 4 | 202 ± 105 | 4 | 60 ± 14 | 4 | 77 ± 18 |
| Meerschweinchen | 3 | 16,4 ± 9,1 | 3 | 13,8 ± 1,5 | 3 | 13,1 ± 0,8 |
| Ratte | - | - | 10 | 29,3 ± 9,2 | | - |

Mittelwerte ± Standardabweichung.
n = Anzahl der Versuche
Die Magenschleimhaut wurde im Bereich der Submucosa von der L. muscularis propria abgezogen.
Sonstige Bedingungen siehe Methodik !
Das pH-Optimum bei der Ratte betrug 5,7, hier wurde auch die ganze Magenwand homogenisiert.

## 3.2. Eigenschaften der Histidindecarboxylasen.

Entsprechend der in Tab. 1 angegebenen Eigenschaften wurde geprüft, ob sich das bei $p_H$ 5,7 bis $p_H$ 7,o sowie das bei $p_H$ 8,o bis 8,1 festgestellte Enzym als saure oder alkalische Histidindecarboxylase charakterisieren liesse.
Deshalb wurden Substrat-und $p_H$-Optima, Michaeliskonstanten, Verhalten gegenüber Benzol, α- Methyl-DOPA, α-Methylhistidin und Pyridoxal-5'-Phosphat der Histidindecarboxylasen bei einer Reihe von Organen und Spezies bestimmt.

### 3.2.1. Substratoptima und Michaeliskonstanten der Histidindecarboxylasen.

Die Michaeliskonstanten der sauren Histidindecarboxylase verschiedener Säugermägen sind verhältnismäßig niedrig. Da die endogene Histidinkonzentration verschiedener Mägen, fluorometrisch bestimmt nach Pisano et al. 1957 (33), zwischen 2 und 5 x $1o^{-5}$M beträgt (endogen = Histidinkonzentration im Ultrazentrifugat), erscheint eine Histidindecarboxylierung in vivo durchaus wahrscheinlich. Sie war auch im Leerwert (= Ansatz ohne Substratzusatz) ausgezeichnet messbar. (Tab. 1o und 11, Abb.2)
Überoptimale Histidinkonzentrationen hemmen die saure Histidindecarboxylase teilweise sehr stark. Beim Menschen bis zu 6o % ($1o^{-2}$M), beim Schwein zu 5o % ($1o^{-3}$M), beim Meerschweinchen bis zu 3o % ($1o^{-3}$M) und bei der Ratte bis zu 35 % ($1o^{-2}$M).
Die Substratoptima der alkalischen Histidindecarboxylase wurden nur in Organen der Ratte bestimmt. Nach Weissbach et al. 196o (47) hat die alkalische ("unspezifische") Histidindecarboxylase eine Michaeliskonstante von $1o^{-2}$M . Diese hohe Michaeliskonstante ist der Grund, warum der alkalischen Histidindecarboxylase in vivo keine Bedeutung beigemessen wurde. Die hier ermittelten Werte der Michaeliskonstanten der alkalischen Histidindecarboxylase liegen wesentlich niedriger. (Tab. 1o und 11, Abb. 2 - 4 )

Tabelle 10

Substratoptima und Michaeliskonstanten der sauren Histidindecarboxylase von Speicheldrüsen, Schilddrüse und Magen.

| Spezies und Organ | Substratoptimum (M) | $K_m$ (M) |
|---|---|---|
| Mensch, Magen | $5 \times 10^{-4}$ | $5{,}7 \times 10^{-5}$ |
| Schwein, Magen | $1 \times 10^{-4}$ | $2{,}0 \times 10^{-5}$ |
| Meerschweinchen, Magen | $5 \times 10^{-4}$ | $3{,}3 \times 10^{-5}$ |
| Ratte, Gl. submandibularis | $1 \times 10^{-2}$ | $1{,}0 \times 10^{-3}$ |
| Gl. parotis | $3 \times 10^{-3}$ | $1{,}0 \times 10^{-4}$ |
| Gl. thyreoidea | $1 \times 10^{-4}$ | - |
| Magen | $1 \times 10^{-3}$ | $2{,}5 \times 10^{-4}$ |

Als Enzympräparate wurden die Ultrazentrifugatextrakte verwendet. Ableitung der Michaeliskonstante ($K_m$) nach LINEWEAVER und BURK (1934), die Michaeliskonstanten- Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Die pH- Werte entsprechen den pH-Optima in Abb. 5 und Tabelle 9, beim Kaninchen pH 7,0.
Sonstige Bedingungen siehe Methodik !

Tabelle 11

Michaeliskonstanten der sauren und alkalischen Histidindecarboxylasen verschiedener Rattenorgane.

| gan | saure Histidindecarboxylase pH | $K_m$ [M] | alkalische Histidindecarboxylase pH | $K_m$ [M] |
|---|---|---|---|---|
| ber | 7,0 | $6 \times 10^{-4}$ | 8,1 | $2 \times 10^{-3}$ |
| ere | 7,0 | $3 \times 10^{-3}$ | 8,1 | $3,3 \times 10^{-3}$ |
| gen | 7,0 | $2,5 \times 10^{-4}$ | 8,1 | $1,4 \times 10^{-3}$ |
| ymus | 7,0 | $6 \times 10^{-4}$ | 8,1 | $8,0 \times 10^{-4}$ |
| .submandi-bularis | 7,0 | $3,3 \times 10^{-3}$ | 8,1 | $2,9 \times 10^{-4}$ |
| . parotis | 7,0 | $1 \times 10^{-4}$ | 8,1 | $6 \times 10^{-4}$ |
| . thyreoidea | 7,0 | $1 \times 10^{-3}$ | 8,1 | $1 \times 10^{-3}$ |
| ıkreas | 7,0 | $1 \times 10^{-4}$ | 8,1 | $4 \times 10^{-4}$ |

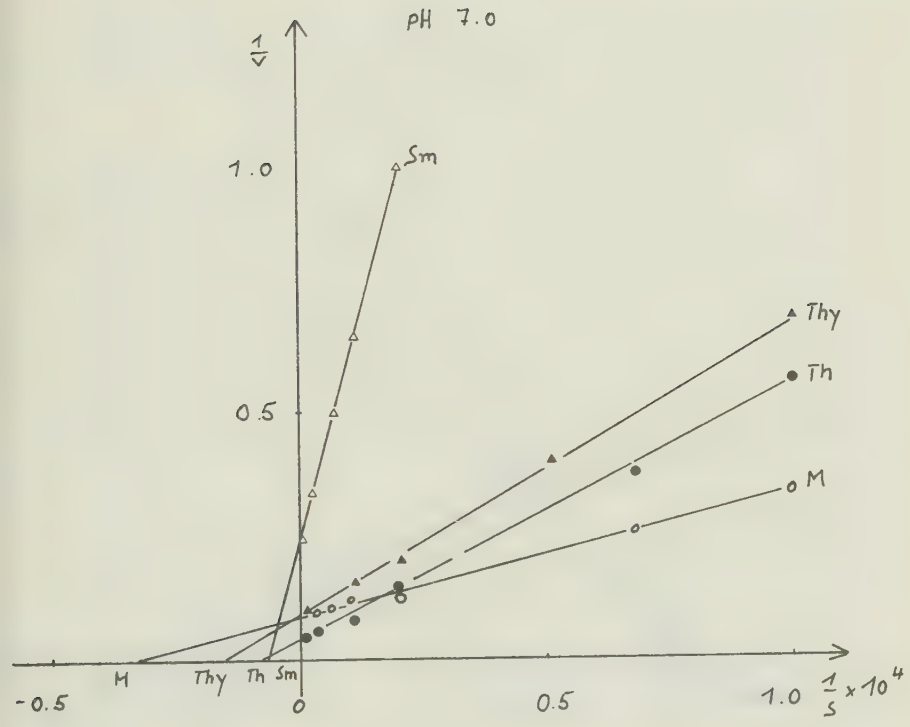


Abb. 2 . Michaeliskonstanten der sauren Histidindecarboxylasen aus verschiedenen Rattenorganen (Ableitung nach Lineweaver und Burk (1934).
Mittelwerte von 2-3 Bestimmungen. v = nMol/min.
$[S] = a \times 10^{-4} [M]$, Enzymlösung 25-45 mg Protein pro Inkubationsmischung. $p_H$-Wert der Inkubation 7,0. Sm = Gl. submandibularis, Thy = Gl. thyreoidea, Th = Thymus, M = Magen.

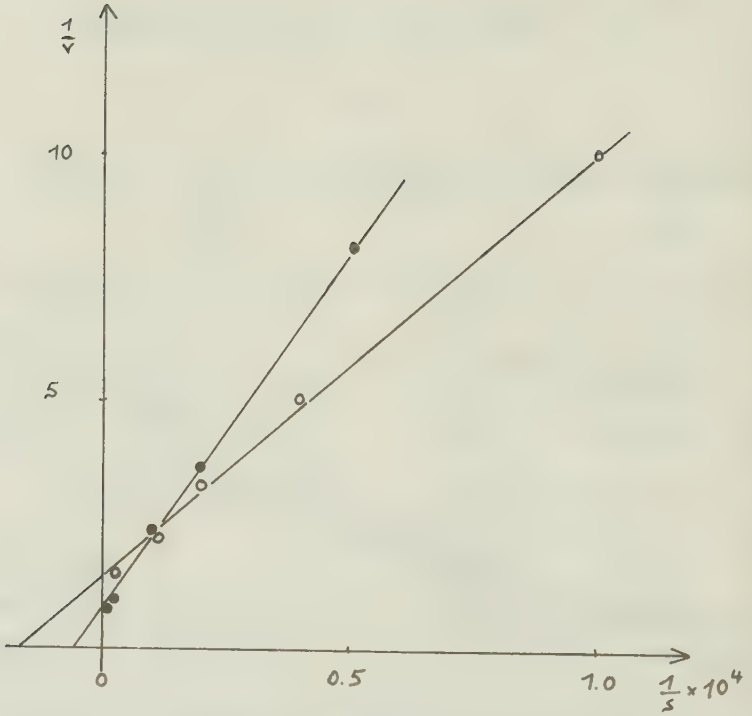


Abb. 3 . Michaeliskonstanten der sauren und alkalischen Histidindecarboxylase der Rattenleber (Ableitung nach Lineweaver und Burk (1934).Mittelwerte von 3 Bestimmungen. v = nMol/min. $[S] = a \times 10^{-4} [M]$, Enzymlösung 25-45 mg Protein pro Inkubationsmischung. o - o saure Histidindecarboxylase ($p_H$ 7,o), ● - ● alkalische Histidindecarboxylase ($p_H$ 8,1).

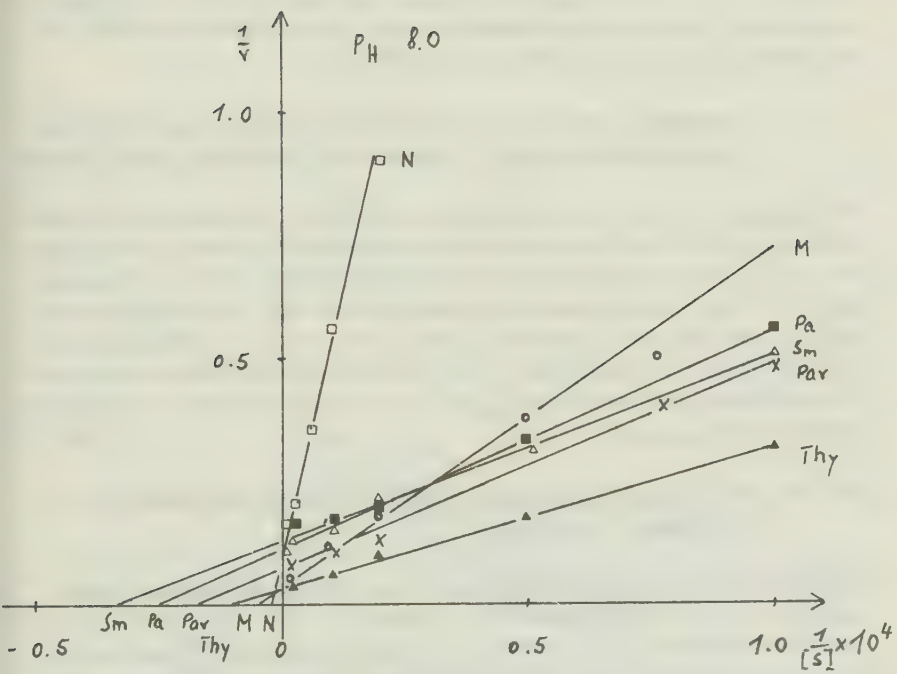


Abb. 4 . Michaeliskonstanten der alkalischen Histidindecarboxylasen aus verschiedenen Rattenorganen (Ableitung nach Lineweaver und Burk (1934). Mittelwerte von 2-3 Bestimmungen. v = nMol/min. $[S] = ax10^{-4}[M]$, Enzymlösung 25-45 mg Protein pro Inkubationsmischung, $p_H$-Wert der Inkubation 8,0; N = Niere, M = Magen, Pa = Pankreas, Sm = Gl.submandibularis, Par = Gl. parotis, Thy = Gl. thyreoidea.

### 3.2.2. pH-Optima der Histidindecarboxylasen

Die pH-Optima der sauren und alkalischen Histidindecarboxylasen sind in Abb. 5 zusammengefaßt.Da der pH-Bereich,in dem die beiden Enzyme aktiv sind,begrenzt ist,so daß sich bei pH 7,3 praktisch keine Decarboxylierung nachweisen läßt,können auf Grund der pH-Optima beide Enzyme differenziert werden.

### 3.2.3. Hemmbarkeit der Histidindecarboxylasen durch DL-α-Methyl-DOPA,DL-α-Methylhistidin sowie Aktivierbarkeit durch Benzol

Wie Tabelle 1 zeigt,hemmt DL-α-Methylhistidin die saure,nicht aber die alkalische Histidindecarboxylase,während DL-α-Methyl-DOPA sich in $1o^{-3}$M Konzentration umgekehrt verhält.Benzol aktiviert dagegen die alkalische Histidindecarboxylase,während es die saure entweder unbeeinflußt läßt oder sogar in mehr oder weniger starkem Ausmaß hemmt.Diese drei Substanzen wurden deshalb zur Differenzierung der beiden Enzyme verwendet (Tab. 12).Dies gelang in allen untersuchten Organen (Tab.13a ,13b).

### 3.2.4. Aktivierung und Hemmung der Histidindecarboxylasen durch Pyridoxal-5'-Phosphat

Pyridoxal-5'-Phosphat,das Coenzym beider Histidindecarboxylasen (siehe Tabelle 1),aktiviert diese Enzyme nur bis zu einer bestimmten Konzentration im Ansatz.Die bei Zusatz grösserer Mengen beobachtete Hemmung findet ihre Erklärung in der Bildung eines Hemmkomplexes zwischen Enzym,Coenzym und Substrat (Schott und Clark 1952 (37) ,Werle und Lorenz 1966 (49),Lorenz und Werle 1967 (26) ). Die Grenzkonzentration von Pyridoxal-5'-Phosphat,bei der ein Übergang von Aktivierung zu Hemmung beobachtet wird,ist von Organ zu Organ verschieden.Er hängt von der endogenen Konzentration von Pyridoxal-5'-Phosphat und Pyridoxinabkömmlingen ab,wenn das Enzymsystem der Pyridoxal-5'-Phosphatsynthese intakt bleibt.Da mitunter eine Erhöhung der Pyridoxal-5'-Phosphatkonzentration um nur $1,3 \times 1o^{-5}$M bereits hemmt (Werle und Lorenz 1966) (49),wurde in den Standardansätzen auf den Zusatz von Coenzym verzichtet.Eine mögliche Aktivierung wurde aber an einer Reihe von Organen überprüft (Tab. 14) und konnte hier bestätigt werden.

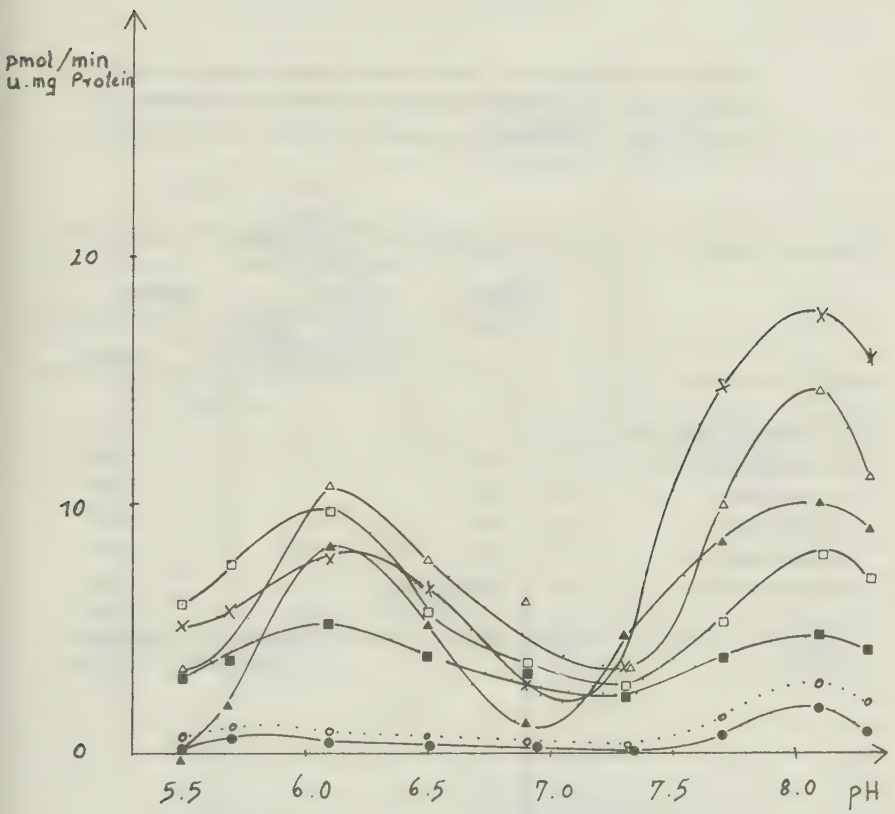


Abb. 5. $p_H$- Aktivitätskurven der Histidindecarboxylierung in verschiedenen Rattenorganen. Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen. Die Substratkonzentration, die bei den einzelnen Organen als optimal ermittelt wurde, ist in Klammern angegeben. x - x Gl. submandibularis ($1x10^{-2}$M), △- △Gl. parotis ($5x10^{-3}$M), ▲-▲Magen ($3x10^{-2}$M), □-□ Gl. thyreoidea ($1x10^{-3}$), ■-■ Pankreas ($1x10^{-2}$), o---o Leber ($1x10^{-3}$M), •—• Niere ($1x10^{-2}$M).

Tabelle 12.

Charakterisierung der sauren und alkalischen Histidindecarboxylase verschiedener Rattenorgane durch α-Methyldopa (α-MD), α-Methylhistidin (α-MH) und Benzol.

| Spezies, Organ | pH | Hemmung bzw. Aktivierung in ±% in Gegenwart von | | |
|---|---|---|---|---|
| | | α-MD $1 \times 10^{-3}$ M | α-MH $1 \times 10^{-2}$ M(a) / $5 \times 10^{-2}$ M(b) | Benzol $2{,}5 \times 10^{-4}$ Mol/3 ml Ansatz |
| Ratte | | | | |
| Gl.submandibularis | 6,1 | 0 | - | - 50 |
| Gl.submandibularis | 8,1 | -40 | - | + 70 |
| Gl.parotis | 6,0 | -25 | - | - 60 |
| Gl.parotis | 8,1 | -100 | - | +100 |
| Gl.thyreoidea | 5,7 | -38 | -100 b | - 32 |
| Gl.thyreoidea | 8,1 | -100 | 0 b | + 64 |
| Magen | 5,7 | 0 | -100 b | - 40 |
| Magen | 8,1 | - 55 | 0 b | +105 |

Inkubation bei optimalen Substratkonzentrationen, als Enzympräparate dienten die Ultrazentrifugatextrakte. Sonstige Bedingungen siehe Methodik !

Tabelle 13a

Aktivitätssteigerung der alkalischen Histidindecarboxylasen verschiedener Rattenorgane durch Benzol.

| Art, Organ | Aktivitätssteigerung in % |
|---|---|
| Ratte: Magen | 125 |
| Leber | 50 |
| Niere | 100 |
| Thymus | 25 |
| Gl. thyreoidea | 45 |
| Gl. submandibularis | 105 |
| Gl. parotis | 100 |
| Pankreas | 165 |

Tabelle 13b

Hemmung der sauren Histidindecarboxylasen verschiedener Organe durch Benzol.

| Art, Organ | Hemmung in % |
|---|---|
| Ratte, Magen | 40 |
| Magen | 32 |
| Leber | 45 |
| Niere | 28 |
| Thymus | 20 |
| Gl. thyreoidea | 26 |
| Gl. submandibularis | 65 |
| Gl. parotis | 60 |
| Pankreas | 90 |

Tabelle 14

Aktivierung der sauren Histidindecarboxylase durch Pyridoxal-5'-Phosphat (PALP).

| Spezies und Organ | Enzym-typ | PALP- Zusatz (Endkonzentration in a x $10^{-5}$M) | Aktivierung in % |
|---|---|---|---|
| Mensch, Magen | sa | 3,13 | 50 |
| Schwein, Magen | sa | 3,13 | 220 |
| Gl.thyreoidea | sa | 3,75 | 70 |
| Gl.thyreoidea | sa | 0 | 0 |
| Ratte, Gl.submandibularis | sa | 3,13 | 110 |

Mittelwerte aus mindestens 2 Versuchen.
sa = saure Histidindecarboxylase.
Inkubation unter optimalen Bedingungen (siehe Methodik und Tabellen 4 - 11)

## 3.3. Aktivitätssteigerung der sauren Histidindecarboxylase in verschiedenen Rattenorganen durch Thyreoideastimulierendes Hormon und 2- Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.

Bei der Untersuchung über die Bedeutung von Histamin in der Schilddrüse,in der das Amin bei vielen Arten sehr reichlich vorkommt, wurde zunächst die saure Histidindecarboxylase bestimmt,da ihr in vivo die größere Bedeutung im Histaminstoffwechsel beigemessen wird.Es stellte sich die Frage,welche Wirkung antithyreoidale Substanzen und das thyreotrope Hormon auf das Enzym in verschiedenen Organen in vivo haben.Unerwarteterweise stieß man dabei auf ein brennendes Problem der Untersuchungen über Histamin,nämlich auf die Frage der Induzierbarkeit der sauren Histidindecarboxylase. (Schayer) (36).
Weibliche Ratten (2oo g Körpergewicht) erhielten Thyreostimulin "Organon" 2 Tage in einer Dosis von täglich 5o I.E./Kg intramuskulär.Danach war die Aktivität der sauren Histidindecarboxylase in den verschiedenen Organen erheblich gesteigert,am meisten in Niere,Thymus und Gl. submandibularis. Tab. 15
Als Ursache dieser Aktivitätssteigerung nach Thyreoideastimulierendem Hormon konnte eine vermehrte Bereitstellung von Coenzym ausgeschlossen werden,denn Zusatz von 3 - 6 x $1o^{-5}$M Pyridoxal-5'-Phosphat (Endkonzentration) zum Ansatz erbrachte bei den mit Thyreoideastimulierendem Hormon behandelten Tieren eine Aktivitätssteigerung um 6o%,bei den Kontrolltieren um nur 1o - 3o%,was darauf hinweist,daß mit Thyreoideastimulierendem Hormon behandelte Tiere eher einen Pyridoxal-5'-Phosphatmangel als eine -Zunahme aufweisen.Das stimmt mit den Befunden von Bergeret et al. 196o (6) überein.
2- Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol,in vitro unter den geprüften Substanzen der stärkste Hemmstoff beider Decarboxylasen (28),vermindert die Enzymaktivität bei Ratten in vivo nicht.Im Gegenteil, die Aktivierung der Histidindecarboxylase nahm beträchtlich zu. Die Zunahme beträgt für Leber,Magen und Niere 13o%,für die übrigen Organe etwa die Hälfte. Tab. 16

Tabelle 15

Aktivitätszunahme der sauren Histidindecarboxylase in Rattenorganen nach Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH).

| Organ | n | Histidindecarboxylierung in pMol/min u. mg Protein | | Aktivitätszunahme in % |
|---|---|---|---|---|
| | | i.m. NaCl | i.m. TSH | |
| Leber | 9 | 0,55 ± 0,10 | 0,86 ± 0,13$^{+}$ | 60 |
| Magen | 3 | 24,8 ± 13,0 | 40,4 ± 20,1 | 60 |
| Niere | 3 | 0,58 ± 0,26 | 1,48 ± 0,25$^{++}$ | 150 |
| Thymus | 3 | 3,1 ± 0,1 | 10,8 ± 1,2$^{++}$ | 250 |
| Gl.submandibularis | 3 | 7,7 ± 0,8 | 15,5 ± 5,0$^{++}$ | 100 |
| Gl.thyreoidea | 1 | 7,0 | 10,5 | 50 |
| Gl.parotis | 1 | 1,0 | 2,4 | 140 |
| Herz | 1 | 1,5 | 2,0 | 30 |

$+ = p < 0,02$ ; $++ = p < 0,05$

Organe von jeweils 10 Tieren gemischt. Mittelwerte ± Standardabweichung. n = Anzahl der Versuche. Zur Bestimmung der Histidindecarboxylase siehe Methodik!

Tabelle 16

Aktivitätszunahme der sauren Histidindecarboxylase in Organen der Ratte nach 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol (MBI)

| Organe | n | Histidindecarboxylierung in pMol/min u.mg Protein | | Aktivitäts-zuwachs in % |
|---|---|---|---|---|
| | | i.m. NaCl | i.m. MBI | |
| Leber | 1o | o,42 ± o,o3 | o,96 ± o,18$^{+}$ | 13o |
| Magen | 4 | 14,8 ± 3,2 | 34,2 ± 4,8$^{++}$ | 13o |
| Niere | 3 | o,7 ± o,2 | 1,6 ± o,3$^{+++}$ | 13o |
| Gl.submandibularis | 3 | 4,1 ± 1,4 | 6,7 ± o,4 | 6o |
| Gl.parotis | 3 | 5,2 ± 3,o | 8,7 ± o,5 | 7o |
| Gl.thyreoidea | 3 | 4,o ± 1,8 | 6,1 ± 2,4 | 5o |

+ = $p < o,o1$ ; ++ = $p < o,oo2$ ; +++ = $p < o,o5$

### 3.4. Hemmung der sauren und alkalischen Histidindecarboxylasen durch 2- Carbäthoxythio-1-methylimidazol

Zur Untersuchung der Frage, ob 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol, eine häufig verwendete antithyreoidale Substanz, die Histidindecarboxylasen *in vivo* zu hemmen vermag, wurden weibliche Meerschweinchen über 21 Tage mit verschiedenen Dosen 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol behandelt. In den entnommenen Organen wurde die Aktivität der sauren und alkalischen Histidindecarboxylase gemessen (Tab.17). In dosisabhängiger Weise nahm sie in allen untersuchten Organen erheblich ab und war nach 3 mg/kg 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol bei der sauren Histidindecarboxylase in Zunge, Gl. submandibularis, Gl. thyreoidea und Thymus sowie in Corpus und Pylorus des Magens, bei der alkalischen Histidindecarboxylase in den gleichen Organen mit Ausnahme des Magens sowie in der Leber nicht mehr nachweisbar.

Wurden nun zum Ansatz mit Organen unbehandelter Tiere Rohextrakte von Organen behandelter Tiere zugesetzt, so war keine Hemmung festzustellen. Die Aktivitätsminderung der Histidindecarboxylase nach Behandlung mit 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol ist also nicht durch die Anwesenheit durch Hemmstoff im Gewebe bedingt, der erst nach Homogenisieren sich an das Enzym anlagert und eine *in vivo* Hemmung vortäuscht.

Auch in Organen der Ratte konnte die Aktivitätsminderung der sauren Histidindecarboxylase nach 3-wöchiger Behandlung mit o,3 mg/kg 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol beobachtet werden, jedoch nicht in Leber und Niere. Höhere Dosen als beim Meerschweinchen wurden bisher noch nicht verwendet (Tab. 18).

Bei Versuchen *in vitro* über die Wirkung von antithyreoidalen Substanzen auf die Histidindecarboxylase zeigte es sich, daß 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol und 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol die beiden Histidindecarboxylasen von Ratte, Meerschweinchen und Schwein stark hemmten und zwar kompetitiv zu Substrat und Coenzym.

Pyridoxal-5'-Phosphatzusatz zum Ansatz war auch nur in wenigen Organen beim Meerschweinchen, z.B. in Leber und Niere, in der Lage, die Enzymaktivität in geringem Ausmaß wiederherzustellen. Die Ursache für die Abnahme der Histidindecarboxylase-Aktivität ist noch nicht sicher geklärt. Eine Repression der Enzymsynthese wäre bei einem raschen Umsatz des Enzymproteins denkbar (36).

Tabelle 17.

Abnahme der Aktivität der sauren und alkalischen Histidindecarb-, oxylase in Organen von mit 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol vorbehandelten Meerschweinchen.

| Organ | HDC-Aktivität bei pH 7,o in pmol Histaminzuwachs/min und mg Protein | | | Abnahme der HDC-Aktivität in % | |
|---|---|---|---|---|---|
| | NaCl (o,9%) | CMI (o,3mg/kg) | CMI (3 mg/kg) | CMI (o,3mg/kg) | CMI (3mg/kg) |
| Zunge | 3,3±o,6 | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| Gl.submandibularis | 1,1±1,1 | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| Gl.thyreoidea | 1,1±o,6 | o,0 | o,o | 100 | 1oo |
| Thymus | 3,2±3,0 | 1,7±1,7 | o,o | 47 | 1oo |
| Oesophagus | 21,6±12,o | 5,3±2,4 | 2,9±1,8 | 76 | 87 |
| Magen, Fundus | 8,3±1,3 | 5,4±2,6 | 1,6±1,2 | 35 | 81 |
| Corpus | 2,1±2,o | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| Pylorus | 3,o±1,5 | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| | HDC-Aktivität bei pH 8,o | | | | |
| Zunge | o,8± o,4 | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| Gl.submandibularis | o,6± o,3 | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| Gl.thyreoidea | 3,2± o,2 | o,o | o,o | 1oo | 1oo |
| Thymus | 5,1± 2,4 | o,4± o,4 | o,o | 92 | 1oo |
| Magen, Fundus | 19,4± 3,8 | 6,7± 1,5 | 5,5±5,5 | 66 | 72 |
| Corpus | 15,2± 6,4 | 9,5± 3,9 | 3,4±1,9 | 37 | 78 |
| Pylorus | 21,2± 8,2 | 12,8± 6,4 | 4,o±4,o | 4o | 81 |
| Niere | 152,o±13,3 | 79,o±28,7 | 63±2o | 48 | 59 |
| Leber | 8,2± 2,8 | 4,1± 1,6 | o,o | 5o | 1oo |

Vorbehandlung der Tiere mit o,5 ml o,9 % NaCl-Lösung (Kontrollen) und o,5 ml 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol (CMI),gelöst in o,9% NaCl . Die Organe von jeweils 1o Tieren wurden zusammengegeben. n = 3.Zur Bestimmung der Histidindecarboxylase siehe Methodik!

Tabelle 18

Abnahme der Aktivität der sauren Histidindecarboxylase in Organen der Ratte nach 3-wöchentlicher Vorbehandlung mit 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol (CMI).

| Organe | n | Histidindecarboxylierung in pMol/min u.mg Protein | | Abnahme in % |
|---|---|---|---|---|
| | | i.m.NaCl (0,9 %) | i.m. CMI (0,3 mg/kg) | |
| Gl. submandibularis | 2 | 10,1 | 0,0 | 100 |
| Gl. parotis | 2 | 5,2 | 3,2 | 40 |
| Gl. thyreoidea | 2 | 10,7 | 1,7 | 84 |
| Magen | 2 | 72,6 | 0,0 | 100 |
| Thymus | 2 | 1,7 | 0,0 | 100 |
| Niere | 2 | 0,4 | 0,5 | 0 |
| Leber | 5 | 0,83 $\pm$ 0,09 | 0,93 $\pm$ 0,15 | 0 |

Die Organe von jeweils 10 Tieren wurden zusammengegeben.
Zur Bestimmung der Histidindecarboxylase siehe Methodik.
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.
n = Anzahl der Versuche.

## 3.5. Wirkung von Cycloheximid und Puromycin auf die Aktivitätssteigerung der Histidindecarboxylase durch Thyreoideastimulierendes Hormon und 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.

Als Ursache der Aktivitätszunahme der Histidindecarboxylase wurde auch die Möglichkeit einer vermehrten Bildung von Apoenzym geprüft. Ratten erhielten Thyreoideastimulierendes Hormon zusammen mit Cycloheximid bzw. Puromycin,also Hemmstoffen der Proteinsynthese.Nach 2-tägiger Behandlung mit Thyreoideastimulierendem Hormon und täglich o,4 mg/kg Cycloheximid sowie 6 mg/kg Puromycin fiel die Aktivität der sauren Histidindecarboxylase sogar unter den Wert der Kontrolltiere ab,was mit der Tatsache übereinstimmt,daß das Enzym einem raschen Umsatz (turnover) unterliegt. (Schayer 1966 ) (36). (Tab. 19

Die bisher als Hypothese geltende Induzierbarkeit der sauren Histidindecarboxylase hat durch diese Befunde an Wahrscheinlichkeit gewonnen.Durch Zusatz von Cycloheximid und Puromycin zum Ansatz sowie durch Zusatz von Organextrakten behandelter Tiere konnte sichergestellt werden,daß die Verminderung der Aktivität der sauren Histidindecarboxylase nicht auf einer Hemmung des Enzyms in vitro beruhte.

6 Tage Behandlung mit 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol und täglich o,2 mg/kg Cycloheximid unterdrückte die Aktivitätszunahme der sauren Histidindecarboxylase in allen Rattenorganen.Die Aktivitätszunahme durch 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol war in der Leber ebenso signifikant wie die Unterdrückung derselben durch Cycloheximid. ( Tab. 2o )

## 3.6. Wirkung von Antazolin auf das Schilddrüsengewicht.

Mit Antazolin,einem Antihistaminicum,beobachtete man bei weiblichen Ratten nach 3-wöchiger Behandlung eine dosisabhängige Verminderung des Schilddrüsengewichtes gegenüber den Kontrolltieren.Sie betrug nach 1o mg/kg täglich etwa 4o%.Die mit 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol behandelten Tiere zeigten eine Zunahme des Schilddrüsengewichtes um 91%. ( Tab. 21 ).

Diese Wirkung legt den Schluß nahe,daß Histamin in der Schilddrüse eine physiologische Rolle spielt.

Tabelle 19

Hemmung der Aktivitätszunahme der sauren Histidindecarboxylase nach Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH) durch Cycloheximid (CH) an Rattenorganen.

| Organe | Histidindecarboxylierung in pMol/min und mg Protein | | |
|---|---|---|---|
| | i.m. NaCl | i.m. TSH | i.m. TSH + CH |
| Leber | o,4 ± o,1 | 1,o ± o,16$^{+}$ | o,3 ± o,1$^{++}$ |
| Gl.thyreoidea | 7,o | 1o,o | 2,9 |
| Magen | 12,7 | 21,8 | 8,o |
| Niere | o,4 | o,65 | o,2 |
| Gl.submandibularis | 8,4 | 14,o | 4,5 |
| Gl.parotis | 3,4 | 18,1 | 3,o |

+ = $p < o,o2$ ; ++ = $p < o,o1$

Die Organe von je 1o Tieren wurden gemischt,mit Ausnahme der Leber.Mittelwerte ± Standardabweichung. n = Anzahl der Versuche = 2, bei der Leber 6 . Zur Bestimmung der Histidindecarboxylase siehe Methodik!

Tabelle 2o

Hemmung der Aktivitätszunahme der sauren Histidindecarboxylase nach 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol (MBI) und Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH) durch Cycloheximid (CH) an Rattenorganen.

| Organe | Histidindecarboxylierung in pMol/min und mg Protein | | |
|---|---|---|---|
| | i.m. NaCl | i.m. MBI | i.m. MBI + CH |
| Leber | o,4 ± o,1 | 1,o ± o,16$^{+}$ | o,3 ± o,1$^{++}$ |
| Magen | 24,2 | 42,3 | 24,o |
| Niere | o,4 | o,5 | o,3 |
| Gl.submandibularis | 4,7 | 6,o | 4,8 |
| Gl.parotis | 2,o | 9,2 | 3,7 |
| Gl.thyreoidea | 7,o | 1o,o | 2,9 |
| | i.m. NaCl | i.m. TSH | i.m. TSH + CH |
| Leber | o,55 | o,85 | o,o |
| Magen | 12,7 | 21,8 | 8,o |
| Niere | o,4 | o,65 | o,2 |
| Gl.submandibularis | 8,4 | 14,o | 4,5 |
| Gl.parotis | 3,4 | 18,1 | 3,o |

+ = $p < o,o2$ ; ++ = $p < o,o1$

Tabelle 21

Wirkung von Antazolin und 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol (MBI) auf das Schilddrüsengewicht von weiblichen Ratten.

| i.m. Verabreichung | Schilddrüsengewicht in mg | Zunahme bzw. Abnahme in ± % | Signifikanz |
|---|---|---|---|
| o,5 ml NaCl (Kontrolle) | 3o,7 ± 2,2 | - | - |
| o,5 ml MBI (5o mg/kg) | 58,5 ± 4,7 | + 91 | 1/2p<o,oo1 |
| o,5 ml Antazolin (1 mg/kg) | 22,3 ± 3,1 | - 27 | 1/3p<o,oo1 |
| o,5 ml Antazolin (1o mg/kg) | 19,3 ± 2,2 | - 37 | 1/4p<o,oo1 |

Die Anzahl der Versuchstiere betrug bei jeder Gruppe 6 , Behandlungsdauer 3 Wochen.Die angegebenen Dosen wurden verabreicht.Von jedem Tier wurden bei der Wägung beide Drüsen verwendet.

## Diskussion

### 1. Isoenzyme

Es stellt sich die Frage,inwieweit Unterschiede hinsichtlich pH-Optimum,Substratoptimum und Michaeliskonstante der in den einzelnen Organen gefundenen Histidindecarboxylasen Artefakte infolge der geringen Reinheit der Enzympräparate oder echte Varianten der Enzyme,also Isoenzyme darstellen.Für das Vorhandensein von Isoenzymen spricht,daß z.B. alle sauren Histidindecarboxylasen,die in der Magenmucosa gefunden wurden,eine relativ niedrige Michaeliskonstante aufweisen.Allerdings schwankt die Größenordnung von Spezies zu Spezies (3o).
Weiterhin besteht eine erhebliche Abweichung zu der von Weissbach beschriebenen spezifischen Histidindecarboxylase hinsichtlich des pH-Optimums,das bei allen untersuchten Rattenorganen zwischen 5,7 und 6,1 liegt,bei anderen Säugern um 7,o oder leicht darunter.Es kann also angenommen werden,daß zumindest in den Mägen verschiedener Säuger solche Isoenzyme vorkommen.Selbst die alkalische Histidindecarboxylase scheint solche Isoenzyme zu haben (29,49).
Heute spricht für das Vorliegen von Isoenzymen,wenn sich die Michaeliskonstante um eine Zehnerpotenz unterscheidet.Die endgültige Prüfung ist erst nach Anreicherung möglich.

### 2. Physiologische Bedeutung der sauren Histidindecarboxylase

Die Aktivität der sauren Histidindecarboxylase läßt sich durch Thyreoideastimulierendes Hormon,durch 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol und Pyridoxal-5'-Phosphat deutlich erhöhen,mit einer Gruppe antithyreoidaler Substanzen,den Thioimidazolen,zu denen auch das 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol gehört sowie mit Cycloheximid und Puromycin dagegen unterdrücken.Die beiden letzten Stoffe sind Hemmstoffe der Proteinsynthese.Die Aktivierung und Hemmung hängt aber auch vom Coenzymgehalt der einzelnen Organe ab (7).
Die Histidindecarboxylasen sind Katalysatoren im Histaminstoffwechsel.Ihre Aktivität ist ein Maßstab für die Bereitstellung von Histamin im Gewebe.So kommt der sauren Histidindecarboxylase etwa bei der Stimulierung der Magensaft- und Speichelsekretion sowie bei der Regulierung des Blutflußes im mikrozirkulatorischen System durch Histamin eine entscheidende Bedeutung zu bei der Nachlieferung eben dieses unmittelbar wirksamen und rasch durch Diaminoxydase und

Histaminmethyltransferase inaktivierten Histamin. Sie setzt einerseits Histamin frei und wird andrerseits durch ein erhöhtes Angebot von Histamin selbst in ihrer Aktivität gebremst. An der Gl. submandibularis von Hund und Katze, sowie an Rattenmägen konnte von Lorenz et al, durch Auslösen von Sekretionen mittels Pilocarpin eine Aktivitätszunahme der sauren Histidindecarboxylase nachgewiesen werden.
Diese sog. Enzyminduktion, die also nicht mehr allein bei der Ratte beobachtet wurde, darf als Argument für die physiologische Bedeutung des Histamins beispielsweise als Stimulator der Magensaft- und Speichelsekretion angesehen werden.

3. Frage der physiologischen Bedeutung der alkalischen Histidindecarboxylase

Weissbach et al. (47) sprach der alkalischen Histidindecarboxylase infolge der von ihm ermittelten hohen Michaeliskonstante von $1o^{-2}$M jede Bedeutung in vivo ab. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es ausnahmslos das Enzym in allen darauf untersuchten Organen nachzuweisen. Im Gegensatz zu Weissbach, der eine Reaktionszeit von 3 Stunden für die Histaminbildung angab, was den Reaktionsablauf unüberschaubar werden läßt, liegt die hier ermittelte Reaktionszeit für eine optimale Decarboxylierung in den ersten 15 Minuten. Im weiteren Verlauf nimmt die Decarboxylierungsgeschwindigkeit stark ab. (Bildung von Hemmkomplexen aus Histidin und Pyridoxal-5'-Phosphat) Die Michaeliskonstante der einzelnen Organe lag teilweise erheblich niedriger als bisher angenommen. Ausgehend von den Substratoptima lag sie z.B. bei der Gl.parotis bei 1 x $1o^{-4}$M, die Schilddrüse wies eine Michaeliskonstante von 2,5 x $10^{-4}$M auf, die Michaeliskonstante aus Enzymen der Magengewebe wurde mit 1 x $1o^{-3}$M ermittelt.
Schayer und Sestokas (1965) (35) konnten beim Meerschweinchen mit α-Methyl-DOPA zeigen, daß markiertes $^{14}$C-Histidin auch in vivo durch die alkalische Histidindecarboxylase decarboxyliert wird. Das Enzym ließ sich bei in vivo-Versuchen an Meerschweinchen in ähnlicher Weise wie die saure Histidindecarboxylase pharmakologisch in seinem Aktivitätsverhalten beeinflussen.
Es scheint also nicht mehr vertretbar, der alkalischen Histidindecarboxylase jegliche Bedeutung in vivo abzusprechen. Die gewonnenen Ergebnisse widerlegen diese Auffassung.

## 4. Hypothese einer physiologischen Bedeutung von Histamin in der Schilddrüse

Unter allen an der Ratte untersuchten Organen wies die Schilddrüse den größten Gehalt an Histamin auf.Entsprechend hoch war auch die Aktivität der Histidindecarboxylasen,sowohl der sauren, als auch der alkalischen,die nur noch im Magen höhere Werte aufwies.

Über die Lokalisation von Histamin in der Schilddrüse sind noch keine schlüssigen Aussagen zu machen.So weist der Mastzellgehalt des Organes zwischen den einzelnen Tieren größere Unterschiede auf (4o).Er ist z.B. bei der Ratte sehr groß.Bei Hund und Meerschweinchen weiß man (49),daß die Zahl der Mastzellen mit dem Histamingehalt nicht parallel verläuft.Histamin kommt also wahrscheinlich hier ebenso wie in Speicheldrüsen und Magen (48,1o) noch in anderen Zellen vor.Auch das Kolloid im Ausschwemmungs- bzw. Neubildungsstadium könnte Histamin binden (49),da die größeren Vakuolen ebenso wie die Mastzellen eine Metachromasie aufweisen (5).

Die Schilddrüsenhormone beeinflussen den Umsatz und die Wirkung der biogenen Amine erheblich.So erhöht etwa Thyreoideaextrakt beim Meerschweinchen die Empfindlichkeit gegenüber Anaphylaxie und Histaminintoxikation (39).Thyroxin verringert die Histamin- und Serotoninresistenz beispielsweise bei der Maus (42),während Methyluracil diese erhöht (43).So erfolgt bei der Ratte durch Hemmung der Darmhistaminase mittels Thyroxin eine Sensibilisierung gegenüber Histamin (32).

Nicht geklärt ist bisher,ob die Erhöhung des Grundumsatzes durch Histamin (39,15,22) über die Schilddrüse,die Nebenniere oder durch peripheren Einfluß des biogenen Amins zustandekommt.Auf Grund des hohen Histamingehaltes und der starken Aktivität der Histidindecarboxylasen,die allerdings nicht spezifisch für die Schilddrüse ist,sowie deren pharmakologische Beeinflußbarkeit,die sich in der Möglichkeit der Hemmung und Induzierung zeigt,muß man auch bei der Schilddrüse an eine physiologische Rolle des Histamins denken,wie sie bei Magen und Speicheldrüse nachgewiesen werden konnte.

5. Therapie histaminbedingter Zwischenfälle durch Repression

Histaminfreisetzung kann z.B. erfolgen durch anaphylaktische Reaktion über eine Antigen-Antikörperreaktion in generalisierter Form,oder durch chemische Freisetzung in direkter Wirkung auf die Histaminspeicher (13).Relaxantien bei der Narkose bewirken solches. Histaminbedingte Zwischenfälle können sich äußern in starkem Blutdruckabfall,Schock,der bis zum Kreislauf-und Herzstillstand gehen kann.Urticaria,Glottisödem und Bronchospasmus können auftreten (1o,1 Hier gäbe sich ein Ansatzpunkt durch Repressionstherapie mit Hemmsubstanzen der Histidindecarboxylase,wie wir sie in den Thioimidazolen (z.B. 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol),in Cycloheximid und Puromycin kennengelernt haben,Wege zur Beherrschung dieser durch Histamin-Liberierung hervorgerufenen Symptome zu beschreiten.Da aber die letzteren Stoffe unspezifisch die Proteinsynthese herabsetzen, sind sie sehr toxisch.Dies schränkt ihre Anwendung sicher ein.

6. Histamin,2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol und Stressulcus: Therapeutische Möglichkeiten

2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol erwies sich bei den Versuchen an Ratten und Meerschweinchen,die damit in vivo behandelt wurden,als eine Substanz,die die Aktivität der Histidindecarboxylase in allen untersuchten Organen unterband oder zumindest stark minderte.

Hier ergeben sich interessante Aspekte für therapeutische Maßnahmen,beispielsweise bei Stressulcera (31).Der Histidindecarboxylase des Magens wird dabei eine bedeutende Rolle zugewiesen (27). Nach Cooke (12,3o) wird die Magensaftsekretion durch Glucocorticoide bei Ratten und Hunden stark stimuliert.Es müßte ein Enzym gesucht werden,das die Steigerung der Magensaftsekretion durch Glucocorticoide erklären könnte (31).Die Histidindecarboxylase des Magens die Histidin zu Histamin und $CO_2$ umsetzt,bietet sich hierfür an (27) So konnte die Histaminlokalisation in den Mastzellen fluoreszenzmikroskopisch (18,31) in der menschlichen Schleimhaut nachgewiesen werden.Hier fand sich auch eine äußerst aktive saure Histidindecarboxylase (3o).Daß Histamin perakute Ulcera erzeugen kann,zeigten Büchner und Molloy (8).So führt z.B. Stress durch Kälte oder Immobilisation zu einer auf das Mehrfache erhöhten Aktivität der Histidindecarboxylase (38,31).

Interessant war auch noch,daß Aminoguanidin,ein spezifischer Hemmstoff des Histaminabbaus,bei der Ratte die Stressulcusrate erhöhte (23).
Es wäre denkbar,daß durch die therapeutische Anwendung antithyreoidaler Substanzen Wege gefunden werden,dem Entstehen von Stressulcera vorzubeugen (31).

## Zusammenfassung.

1. Erstmals fluorometrisch und ohne die Isotopenmethode gelang der Nachweis der sauren Histidindecarboxylase in der Magenmucosa des Menschen,sowie in Herz,Leber und Niere von Ratten.Ausschlaggebend dabei war die Verkürzung der Reaktionszeit auf eine Dauer von maximal 15 Minuten.Es wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Decarboxylierung gemessen,wobei Nicotinamid ($1 \times 1o^{-2}$ M) als Hemmstoff der Histaminnucleotidbildung Verwendung fand.

2. Der größte Gehalt an Histamin fand sich bei Ratten in der Schilddrüse,der niedrigste in Leber und Niere.Die Ergebnisse wurden durch Serienversuche ermittelt.

3. Entsprechend ihrem Wirkungsoptimum bei pH 5,7 - 6,o (Rattenorgane) und pH 8,o - 8,1 sind beide Enzyme als saure und alkalische Histidindecarboxylase benannt.Sie waren in allen untersuchten Organen nachzuweisen,wobei die höchste Aktivität im Magen,in Schild- und Speicheldrüsen zu verzeichnen war,analog dem hohen Histamingehalt dieser Organe.Die niedrigsten Werte ergaben sich bei Leber und Niere der Ratte.Erstmals konnte ihre Aktivität auch in Pankreas und Duodenum bestimmt werden.Eindeutig charakterisieren ließen sich beide Enzyme durch DL-α-Methylhistidin (Hemmung der sauren) und DL-α-Methyl-DOPA ($1o^{-3}$M) (Hemmung der alkalischen Histidindecarboxylase,nicht der sauren).Benzol führte bei der alkalischen Histidindecarboxylase zu einer Aktivierung besonders im Pankreas,Magen, Gl.submandibularis,Gl.parotis und Niere,weniger in Thymus und Gl. thyreoidea und hemmte die saure Histidindecarboxylase vornehmlich in Pankreas,Gl.parotis und Gl.submandibularis,in geringerem Maße in Schilddrüse,Thymus und Niere.
Die Michaeliskonstante hatte bei der sauren Histidindecarboxylase ihren niedrigsten Wert in Pankreas und Gl. parotis,ihren höchsten in der Gl. submandibularis.Die bisher für die alkalische Histidindecarboxylase angegebene Michaeliskonstante von $1 \times 1o^{-2}$M erwies sich als zu hoch.Die hier ermittelten Werte lagen zwischen $4 \times 1o^{-4}$M im Pankreas und $3,3 \times 1o^{-3}$M in der Niere.

4. Die saure und soweit untersucht auch die alkalische Histidindecarboxylase waren induzierbar.Bei in vivo Versuchen an Ratten ergaben sich die höchsten Aktivitätszunahmen in Thymus,Niere und

Schilddrüse, die geringsten am Herzen. 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol bewirkte einen kräftigen Aktivitätszuwachs in der Gl. thyreoidea, Gl. submandibularis und Gl. parotis. Die höchsten Werte ließen sich in Leber, Niere und Magen registrieren. Er ließ sich durch 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol dosisabhängig mindern oder gang aufheben.

5. Eine 100% ige Hemmung beider Enzyme durch 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol wurde beim Meerschweinchen in Zunge, Gl. submandibularis und Thymus erreicht. Die alkalische Histidindecarboxylase wurde noch in Leber, die saure im Corpus und Pylorus vollständig inaktiviert. Bei Ratten ließ sich die saure Histidindecarboxylase 100% in Magen, Thymus und Gl. submandibularis, nicht aber in Leber und Niere unterdrücken.

6. Eine Hemmung der Induktion der Histidindecarboxylasen wurde auch unter Cycloheximid und Puromycin beobachtet. Eine physiologische Bedeutung in den einzelnen Organen erscheint wahrscheinlich. Es sei in diesem Zusammenhang nur auf die Beziehung zwischen Histamin und Magen-bzw. Speichelsekretion hingewiesen. Eine als durchaus möglich zu wertende Funktion von Histamin in der Schilddrüse bedarf zur Stützung dieser Hypothese noch weiterer Untersuchungen.

## Literatur


1. Arvy,L., Quiry,C.R.: Soc. Biol. 149 , 658 (1955)
2. Aures,D., Clark,W.G.: Analyt. Biochem. 9 ,35 (1964)
3. Awapara,J., Sanman,R.P., Stanley,C.: Archs. Biochem. Biophys. 98 , 25o (1962)
4. Awapara,J., Perry,T.L., Stanley,C., Peck,E.: Clin. chim. Acta 1o , 286 (1964)
5. Bargmann,W.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie d. Menschen, s. 2-136, Inners. Drüsen I. (1939)
6. Bergeret,B.,Labuesse,I., Chatagner,F.: Biochim. Biophys. Acta
   Labuesse,I., Chatagner,F., B. Jolles-Bergeret: Biochim. Biophys. 38 , 372 (196o)
7. Braunstein,A.E.: Pyridoxal Phosphate in "The Enzymes" (Eds. P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck) s. 126, Academic Press,New York (196o)
8. Büchner,F., Molloy,P.S.: Klin. Wschr. 6 , 2193 (1927)
9. Burkhalter,A.: Biochem. Pharmacol. 11 , 315 (1962)
1o. Code,C.F.: Ciba Foundation Symp. on Histamin, S. 1891 Churchill London (1956)
11. Code,C.F.: Federat. Proc. 24 , 1311 (1965)
12. Cooke,A.R.: Gastroenterology 52 , 272 (1967)
13. Doenicke,A., Lorenz,W.: Der Anaesthesist 19 , 413-417 (197o)
14. Erjavek,F., Beaven,M.A., Brodie,B.B.: Federat. Proc. 26 , 237 (1967)
15. Euler,U.v., Liljestrand,G.: Scand. Arch. Physiol. 55 , 1 (1929)
16. Grossmann,M.I.: Handbook of Physiology, Section 6: Alimentery Canal. p. 835, Williams and Wilkins Campany Baltimore (1967)
17. Hagen,P.: Br. J. Pharmac. 18 , 175 (1962)
18. Håkanson,R., Lilja,B., Owmann,C.: Histochemie 18 , 74 (1969)
19. Kahlson,G., Rosengren,E., Svahn,D., Thunberg,R.: J. Physiol. 167 , 45 (1963)
2o. Kahlson,G., Rosengren,E., Svahn, D., Thunberg,R.: J. Physiol. (Lond.) 174 , 4oo (1964)
21. Kim,Y.S., Glick,D.: Gastroenterology 55 , 657 (1968)
22. Knipping,H.W., Steiger,J.: Z. ges. exp. Med. 64 , 594 (1929)
23. Levine,R.J., Senay,E.C.: Amer. J. Physiol. 214 , 892 (1968)

24. Lorenz,W.,Pfleger,K., Werle,E.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak., exp. Path. 257 (1967) 38

25. Lorenz,W.,Pfleger,K., Werle,E.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp. Path. Pharmacol. 258 , 15o (1967)

26. Lorenz,W., Werle,E.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 348 , 319 (1967)

27. Lorenz,W., Pfleger,K.: Klin. Wschr. 46 , 57 (1968)

28. Lorenz,W., Pfleger,K., Werle,E.: Biochem. Pharmacol. 17, 539 (196

29. Lorenz,W.: Thesis, University of Munich, 1969

3o. Lorenz,W., Halbach,St., Gerant,M., Werle,E.: Biochem. Pharmacol. Vol. 18 ,pp. 2625 -2637 (1969)

31. Lorenz,W., Feifel,G.: Deutsche Med. Wschr. Nr. 36 1848 - 1850 (197o)

32. Parrat, West,G.B.: Gland. Int. Archs. Allergie 16 , 288 (196o)

33. Pisano,J.J., Mitoma,C., Udenfriend,S.: Nature, Lond. 18o , 1125 (1957)

34. Rosengren,E.: Acta Univ. Lund Sect. II, Nr.8 (1966)

35. Schayer,R.W., Sestokas,E.: Biochim biophys. Acta (Amsterdam) 111 , 557 (1965)

36. Schayer,R.W.: Handbuch der exp. Pharmakologie Bd. 18 , S. 688 (1966)

37. Schott,H.F., Clark,W.G.: J. biol. Chem. 196 , 449 (1952)

38. Schwartz,J.C., Cohen,Y., Valette,G.: Biochem. Pharmacol. 15, 2122 (1966)

39. Selle,W.A.: Texas Reports 4 , 168 (1946)

4o. Seyle,H.: The Mastcells, Butterworth, Washington, s. 92, 1o4 (1965)

41. Shore,P.A., Burkhalter,A., Cohn jr., V.H.: J. Pharmakol. exper. Therapeutics 127 , 182 (1959)

42. Spencer,P.S.J., West,G.B.: Br. J. Pharmac. Chemoth. 17 ,137 (1961

43. Spencer,P.S.J., West,G.B.: Archs. Int. Pharmacodyn 148 , 31 (1964

44. Udenfriend,S.: Chem. and Biol. Aspects of Pyridoxal-Catalysis, Proceedings of a Symposium of the Intern. Union of Biochemists s. 267. Pergamon Press, Oxford (1963)

45. Waton,N.G.: Br. J. Pharmac. 11 , 119 (1956)

46. Weichselbaum,T.E.: Amer. Clin. Pathol. 1o4o (1946)

47. Weissbach,H., Lovenberg,W., Udenfriend,S.: Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 5o , 177 (1960)

48. Werle,E., Lorenz,W.: Z. Physiol. Chem. 338, 251 , (1964)

49. Werle,E.,Lorenz,W. : Biochem. Pharmacol. 15 , 1059-1069 (1966)
50. Werle,E.,Lorenz,W. : Archs. Int. Pharmacodyn. Therap. 161, 477 (1966)
51. Werle,E.,Aures,D. : Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 316 , 45 (1959)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle und Herrn Prof. Dr. W. Lorenz bin ich sehr zu Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas und insbesondere für die stets großzügige und unterstützende Betreuung der Arbeit im Labor.

Lebenslauf

Als Sohn des Dr. med. Karl-Heinz Gerant und seiner Ehefrau Eva,geb. Rauhut,wurde ich am 27.1.1940 in Berlin geboren.

1946 Eintritt in die Volksschule Schweitenkirchen/Obb.

1951 Übertritt in das Humanistische Gymnasium Regensburg

1960 Im Juni Abitur am Humanistischen Gymnasium Regensburg
Im Herbst Beginn des Medizinstudiums an der Universität Erlangen-Nürnberg.

1963 Im Frühjahr Physikum an der Universität Erlangen-Nürnberg
Im Herbst Immatrikulation an der Universität München

1967 Im Frühjahr medizinisches Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Anschließend Beginn der Doktorarbeit am Klinisch-Chemischen Institut der Chirurgischen Universitätsklinik München

1969 Im Juni chirurgische Assistentenstelle an der Maria-Theresia-Klinik in München angenommen.Bis zum heutigen Tag dort tätig.